

З. В. Маршавина, С. Г. Асланян

К определению ростстимулирующей активности метаболитов микроорганизмов в жидких питательных средах

Имеющиеся в настоящее время литературные данные позволяют сказать, что многие виды почвенных микроорганизмов способствуют росту и развитию растений не только своим участием в мобилизации питательных элементов почвы, а также благодаря прямому снабжению растений веществами высокой физиологической активности — витаминами, ферментами, ауксинами, гиббереллинами, антибиотиками и другими, пока не изученными метаболитами, синтезируемыми микробной клеткой.

В лаборатории почвенной микробиологии Института микробиологии АН АрмССР уже несколько лет ведутся работы по выяснению влияния метаболитов почвенных микроорганизмов на рост и развитие растений. В связи с этим изучены многие группы почвенных микроорганизмов и выяснен характер действия их метаболитов на кукурузу, табак и свеклу.

На основании наших и других опытов стало известно также, что среди продуцируемых микроорганизмами ростстимулирующих веществ большое место занимают гиббереллины и ауксины, а также подобные им вещества. В настоящее время такие ауксино- и гиббереллиноподобные вещества обнаружены во многих органах растений (Паносян, Арутюнян, Маршавина, 1960; Simpson, 1958; Mecombe, Carr, 1958; West, Phinney, 1956). Широкое распространение ауксинов, гиббереллинов и подобных им веществ заставляет думать о их чрезвычайной роли в жизни растений и микроорганизмов и, особенно, в формообразовательных процессах. Однако изучение указанных вопросов затруднительно из-за отсутствия методов обнаружения их в тканях растений и особенно в культуральных жидкостях микроорганизмов. Надо отметить к тому же, что

существующие методы обнаружения гиббереллинов пригодны лишь для определения гибберелловой кислоты (A_3).

Используя существующие методы определения ауксина (ИУК) и гиббереллина (A_3), нам удалось несколько переработать их и составить схему определения ауксинов, гиббереллинов и подобных им соединений в культуральных жидкостях микроорганизмов. В схеме используется хроматографическая очистка культуральных жидкостей (питательная среда, где выращивались микроорганизмы), работа с элюатами, метод гистограмм и биологических проб.

Предлагаемая схема позволяет судить не только о наличии гибберелловой кислоты (A_3) и ИУК в культуральных жидкостях микроорганизмов, а также о наличии ауксино- и гиббереллиноподобных соединений и о степени их активности.

Извлечение физиологически-активных веществ типа ауксина и гиббереллина из культуральных жидкостей микроорганизмов

Семидневная культура микроорганизмов фильтровалась через бумажный фильтр и подвергалась очистке для последующего хроматографического разделения. Для этого 5 мл отфильтрованной культуральной жидкости помещалось в делительную воронку (на 100 мл), куда добавлялось 5 мл цитратного буфера с $pH=2,5$ (разбавленного в 5 раз) и 10 мл этилацетата. Смесь несколько раз тщательно взбалтывалась и оставлялась на 1 час для полного расслоения.

В кислой среде в этилацетат практически полностью переходят не только ауксины и гиббереллины, но и подобные им соединения. После расслоения смеси через кран сливался нижний водный слой жидкости и взмученная часть этилацетата. Затем 5 мл из оставшегося этилацетата переносились в другую сухую делительную воронку, добавлялось 5 мл фосфатного буфера с $pH=7$, и смесь встряхивалась несколько раз и вновь оставлялась для расслоения на $1/2-1$ час. В этом случае в фосфатный буфер переходят ауксины, гиббереллины и подобные им вещества. Нижний фосфатный слой сливался через кран воронки и использовался для хроматографического разделения ауксино- и гиббереллиноподобных веществ.

Некоторые авторы для извлечения гиббереллинов и ауксинов пользуются вместо этилацетата бутанолом. На наш взгляд, этилацетат имеет больше преимуществ. Во-первых, этилацетат меньше извлекает воды, чем бутанол. Бутанол извлекает 20% воды, этилацетат—3%. Этилацетат более летуч, он улетучивается при—77°C, бутанол—при 118°C и, наконец, в биологическом опыте этилацетат менее токсичен, чем бутанол.

300 γ буферного экстракта наносилось полосой на хроматографическую ленинградскую бумагу № 2 Б. Бумага предварительно разрезалась на полоски шириной 8 см и длиной 35 см. После нанесения экстракта на линию старта и высушивания под ФЭН-ом полоски бумаги ставились в стеклянные камеры для разгонки. На дно камер помещались фарфоровые лодочки с растворителями: для гиббереллиноподобных веществ—изопропиловый спирт, вода (1:1), для ауксиноподобных—бутанол, аммиак, вода (4:1:5).

Разгонка ауксиноподобных веществ длилась 19 часов, разгонка гиббереллиноподобных соединений—24 часа.

После высушивания хроматограммы разрезались на одинаковые поперечные полоски (сегменты) шириной 2, 3 см, которые использовались для биологических проб. Сегменты нумеровались, начиная от линии старта.

Биологический опыт для определения активности ауксиноподобных веществ ставился на колеоптилях пшеницы по методу Бояркина (1948).

Полоски хроматограммы помещались в специальные стеклянные лодочки, заливались 3 мл фосфатно-цитратного буфера с pH 7,5, куда вставлялись стеклянные иглы с нанизанными на них отрезками колеоптилей пшеницы. Опыт снимался после 24-часового выдерживания лодочек в термостате при температуре 25—26°C. По приросту отрезков колеоптилей судили о наличии и активности ауксинов и ауксиноподобных веществ фильтрата.

Многочисленные контрольные опыты, проведенные описанным выше образом с чистой β-индолилуксусной кислотой (ИУК), показали:

1. При извлечении ИУК из раствора последняя практически полностью переходит в этилацетат (табл. 1).

2. При хроматографическом разделении ИУК описанным выше методом последняя распределяется в третьем сегменте.

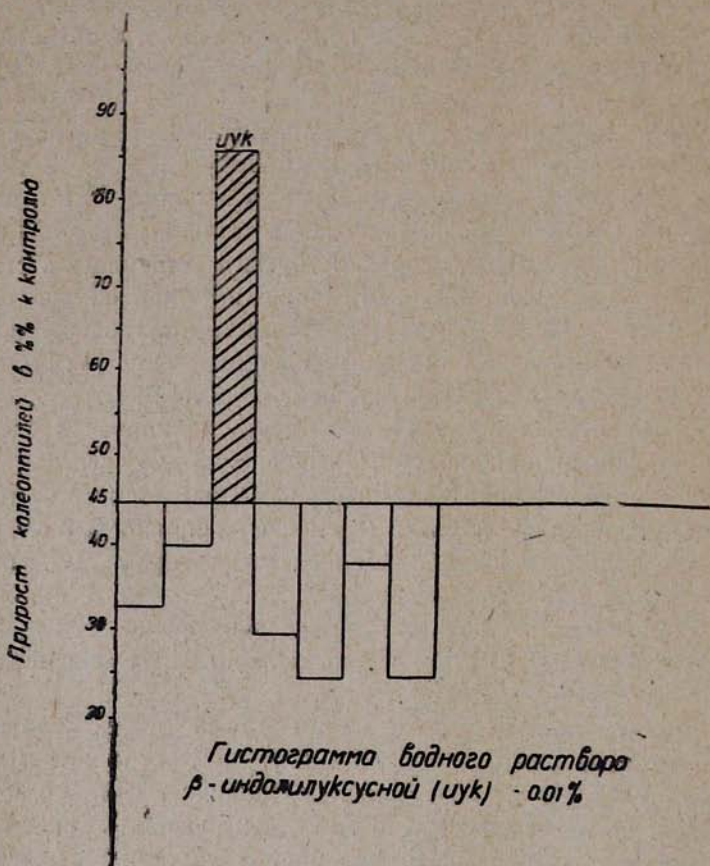


Рис. 1.

3. В биологическом опыте удалось показать тождество между активностью неразогнанного раствора ИУК и элюатом третьего сегмента, где после хроматографического разделения раствора распределяется ИУК (гистограмма 1).

4. В других сегментах хроматограмм при разгонке раствора ИУК активности не наблюдалось.

При биологическом испытании отрезков хроматограмм культуральных жидкостей микроорганизмов получается гамма результатов. Ростовая активность, обнаруживаемая в других сегментах, говорила о наличии и степени активности ауксиноподобных соединений.

Для определения наличия и степени активности гиббереллинов и гиббереллиноподобных веществ в биологическом опыте использовался метод Муромцева (1962). Для этого семена карликового гороха сорта «Пионер» намачивались, затем лезвием удалялась нижняя часть горошины, отсекался кончик корешка, чтобы предотвратить в дальнейшем излишнее ветвление корня, и таким образом обработанные горошины помещались в узкий химический стаканчик (150 см³), на дно стаканчиков помещались разрезанные сегменты хроматограмм, стаканчики закрывались часовыми стеклами и помещались в термостат при температуре 25—26°C на 4 суток.

Активность гиббереллиноподобных веществ определялась по длине стебелька гороха. Полученная гамма результатов испытания одной хроматограммы позволяла судить о наличии активных соединений типа гиббереллинов.

Контрольные опыты, проведенные вышеописанным образом, с очисткой и извлечением гибберелловой кислоты (A_3) из водных растворов, показали:

1. При извлечении A_3 из водного раствора гибберелловая кислота практически полностью переходила в этилацетат (98%) (табл. 2).

2. При хроматографическом разделении A_3 распределялась в 8-м сегменте (гистограмма 2).

3. В биологическом опыте было показано тождество между активностью неразогнанного раствора A_3 и элюатами 8-го сегмента, где после хроматографического разделения распределялась гибберелловая кислота.

При применении описанной методики необходимо соблюдать следующие условия: 1—строгое соблюдение стандартности температур; 2—полное высушивание хроматограмм

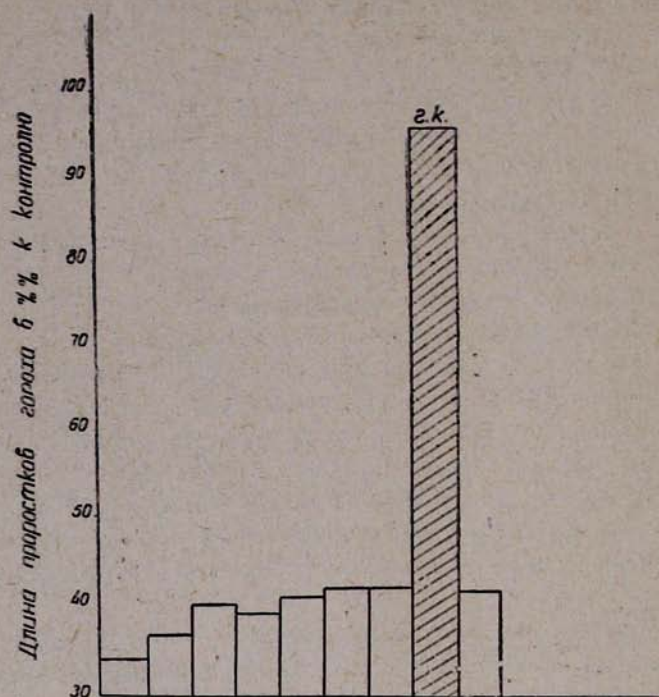


Рис. 2. Гистограмма гибберелловой кислоты —0,01%.

Таблица 1

Активность элюатов сегментов хроматограммы с ИУК в биологическом опыте

№ сегмента хроматограммы	г/л	Длина coleoptiles в мм	Прирост в % к контролю
1	0,07	63	32,5
2	0,21	65	37,5
3	0,35	84	85,0
4	0,49	62	30,0
5	0,69	60	25,0
6	0,76	65	37,5
7	0,91	60	25,0
ИУК		90	100,0
Вода		68	45,0

Таблица 2

Активность элюатов сегментов хроматограммы с гибберелловой кислотой

№ сегмента хроматограммы	rf	Длина стебельков гороха в мм	Прирост в % к контролю
1	0,06	45,	36,0
2	0,18	47,5	38,4
3	0,30	53,2	42,4
4	0,42	51,2	41,0
5	0,54	53,7	43,2
6	0,66	54,5	44,0
7	0,78	48,7	39,2
8	0,90	122,5	98,4
9	0,98	53,7	43,2
Гибберелловая кислота (A ₃)		125,0	100,0
Вода		40,0	32,0

при комнатной температуре; 3—хранение буферных растворов в холодильнике; 4—в серии опытов должны использоваться одни и те же микропипетки, так как из-за неточности градуировки может быть большая ошибка.

2. 4. ՄԱՐՇԱՎԻՆԱ, Ս. Գ. ԱՍԼԱՆՅԱՆ

ԲՈՒՅՍԵՐԻ ԱՃԵՑՈՂՈՒԹՅՈՒՆԸ ԽԹԱՆՈՂ ՄԻԿՐՈՐԳԱՆԻԶՄՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎ ՄԵՏԱԲՈՒՏՆԵՐԻ ՈՐՈՇՈՒՄԸ ՀԵՂՈՒԿ ՍՆՆՎԱՄԻՋԱՎԱՅՐՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Սույն հոդվածում ցույց են տրված՝ հեղուկ սննդամիջավայրում բույսերի աճեցողությունը խթանող միկրոօրգանիզմների ակտիվ մետաբոլիտների որոշման փոփոխված նոր եղանակի բնորոշ կողմերը և նրա առավելությունները:

Հեղուկ սննդամիջավայրում այդ նոր եղանակով հեշտությամբ հնարավոր է հայտնաբերել ինչպես աուկսինը, գիրբերիլինը և բույսերի աճեցողությանը նպաստող այլ բնույթի նյութերը, այնպես էլ այդ խթանիչ միացությունների ակտիվության աստիճանը և վերջիններիս բույսերի աճեցողության ու զարգացման վրա թողած համեմատական պատկերը:

Z. V. Marshavina, S. G. Aslanian

On the determination of growthpromoting activity of microbial metabolites in fluid media

The method presented permits to reveal auxins, gibberellins and related substances in the cultural medium of microorganisms. The method also helps to determine the degree of activity of substances under study and to obtain a comparative picture of their activity on the plant. The activity of cultural medium of microorganisms may be judged only when pure substances are used in the experiments.

ЛИТЕРАТУРА

1. Паносян А. К., Арутюнян Р. Ш., Маршавина З. В. ДАН АрмССР, 1960, т. 31, № 2.
2. Simpson G. M., „Nature“, 1958, 181, p. 4634.
3. Mecombe A. J., Carr D. I., „Nature“, 1958, 181, p. 1548.
4. West G. A., Phinney B. O. Plant Physiolog. (Suppl), 31, 1956, XX, 8:45.
5. Бояркин А. Н. ДАН СССР, т. 59, № 9, стр. 1651.
6. Муромцев Г. С., Нестюк М. Н. «Изв. АН СССР», 1962, № 6, стр. 825.